

未分化型胃癌の遺伝子発現はゲノムと組織環境によってどのように  
調節されているか

17590300

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)

## 研究成果報告書

平成 20 年 1 月

研究代表者： 杉原 洋行  
滋賀医科大学医学部助教授

滋賀医科大学附属図書館



2006016653

## <はしがき>

遺伝子発現が組織環境によってどのように調節されているのかは、今後情報を集積しなければならない重要な研究領域の一つである。この研究では、染色体レベルで遺伝子発現 profile を解析できる comparative expressed sequence hybridization (CESH) の改良から始め、改良した方法による CESH と comparative genomic hybridization (CGH) を、食道扁平上皮癌と、腫瘍の進展や細胞分化によって細胞間接着がダイナミックに変化する未分化型胃癌の、腫瘍内の多数箇所から採取した凍結材料に用いて、遺伝子発現が、どの程度組織環境や epigenetic な変化によって、またどの程度ゲノムの変化によって調節されているかを明らかにしようとした。研究の遂行課程で腫瘍細胞のサンプリングの容易な食道扁平上皮癌の研究が先行し、この材料を用いて、早期癌や進行癌の表層部では環境からの発現誘導や epigenetic な変化が目立ったが、進行癌の深部では次第にゲノムコピー数依存性の遺伝子発現になっていくことが明らかになった。

## 研究組織

研究代表者： 杉原 洋行 (滋賀医科大学医学部・助教授)

(研究協力者： 凌 志強、龍田 健、中村悦子、馬場 正道)

## 交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	1,500	0	1,500
平成 18 年度	1,400	0	1,400
総計	2,900	0	2,900

## 研究発表

### 1) 学会誌等

1. Nakamura E, Sugihara H, Bamba M, Hattori T.: Dynamic alteration of the E-cadherin/catenin complex during cell differentiation and invasion of undifferentiated-type gastric carcinomas. *Journal of Pathology*, 205 (3): 349-358, 2005.
2. Ling Z-Q, Sugihara H, Tatsuta T, Mukaisho K, Hattori T. Optimization of comparative expressed sequence hybridization for genome-wide expression profiling at chromosome level. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 175 (2), 144-153, 2007.
3. Bamba M, Sugihara H, Becker K-F, Becker I, Hoefler H, Hattori T. A case of multiple diffuse gastric carcinoma with regional expression of mutant E-cadherin. *Virchows Arch* (in press).
4. Ling Z-Q, Sugihara H, Tatsuta T, Mukaisho K, Hattori T. Stepwise acquisition of genomic dosage-dependent gene expression during progression of esophageal squamous cell carcinomas. (in submission)

## 2) 口頭発表

1. Ling Z-Q Sugihara H, Tatsuta T, Mukaiisho K, Hattori T. CESH studies of global gene expression in gastric cancer cells: a comparison with CGH analysis. 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005. 4. 14.
2. 馬場正道, 杉原洋行, 中村悦子, 服部隆則 : 胃印環細胞癌における変異 E-cadherin 発現の変化と細胞分化・浸潤との関係. 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005. 4. 14.
3. 中村悦子, 杉原洋行, 馬場正道, 服部隆則 : 細胞分化と浸潤にともなう E-カドヘリン/カテニン複合体の変化は未分化型胃癌の由来によって異なる. 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005. 4. 14.
4. Zhi-Qiang Ling, Hiroyuki Sugihara, Takeshi Tatsuta, Ken-ichi Mukaiisho, Takanori Hattori. Comparative analyses genomic DNA copy number and mRNA expression levels at chromosome level in gastric cancer cell lines. 第15回日本サイトメトリー学会(名古屋), 2005. 7.1.
5. 杉原洋行、凌 志強、龍田 健、向所賢一、服部隆則. Comparative expressed sequence hybridization (CESH)による染色体レベルでの網羅的遺伝子発現解析. 第64回日本癌学会総会(札幌), 2005. 9. 16.
6. Ling Z-Q Sugihara H, Tatsuta T, Mukaiisho K, Hattori T. Global gene expression and genomic copy-number profiling in esophageal squamous cell carcinomas. 第95回日本病理学会総会(東京), 2006. 5. 1.
7. 馬場 正道、杉原 洋行、中村 悦子、服部 隆則 : Diffuse-type 胃癌の細胞分化と進展における wild-type 及び mutant E-cadherin の発現. 第95回日本病理学会総会(東京), 2006. 5. 1.
8. Ling Z-Q Sugihara H, Tatsuta T, Mukaiisho K, Hattori T. How DNA copy number and tissue environment regulate gene expression in gastroesophageal carcinomas. 第96回日本病理学会総会(大阪), 2007. 3. 13.
9. 馬場 正道、杉原 洋行、服部 隆則 : 免疫組織学的に mutant E-cadherin 発現を確認し得た多発胃印環細胞癌の一例. 第96回日本病理学会総会(大阪), 2007. 3. 13.
10. Ling ZQ, Sugihara H, Hattori T: Comparative genomic and expressed sequence hybridization for global epigenetic profiling at chromosome level. 第66回日本癌学会学術集会(横浜), 2007. 10. 4.

## 研究成果

### <初年度の研究計画と方法>

初年度の計画では1) 胃癌細胞株(Kato IIIとAGS)より抽出したRNAより作成した同一のcDNAを使って、様々な方法で標識した後、CESHとcDNAマイクロアレイ解析を行い、どの標識が一致率が高いかを決定すること、2) CESHとCGHの対応付けをすることにより、腫瘍における遺伝子発現の変化がどの程度ゲノムのコピー数に依存しているのか、epigeneticな変化や環境からの誘導などがどの程度あるのかを明らかにすること、3) 以上の網羅的なアプローチをE-cadherin遺伝子について蛋白レベルの発現がどの程度ゲノムと環境に依存しているのかを明らかにすることを主な目標とした。

### <初年度の結果と考察>

1)では、胃癌細胞株Kato IIIを用いて、CESHでT/R比のシフトの見られた48領域のマイクロアレイスポットのT/R比の平均を計算し、CESHの結果および28領域についてはRT-PCRの結果と対比した。test DNAをcy5で、reference DNAをcy3で種々の標識でCESHを行い、結果を比較した。cDNAマイクロアレイとの一致率の最も高かったのは、mRNAを用い、random primerによるpost-cDNA標識またはpre-cDNA標識を行った場合であった。これまでの報告でCESHに用いられてきたPCR標識によるpost-cDNA標識では一致率が35%と非常に低く、使用に堪えないことがわかった。この一致率の低い原因は、全体的に感度が低いことに加え、(同一のプローブをtestとreferenceに使った)self-matched CESHでもfalse positive signalが出ることによるものであった。このfalse positive signalは、標識の色素を逆にしても逆転しなかったことから確認された。このように、従来のCESHは感度と特異度の両方に問題があることが分かった。

そこで、感度を上げるために、total RNAを使う代わりにmRNAを使うこと、微量なmRNA由来のcDNAを効率よく増幅するためにDOP-PCRを使うことにし、また特異度を上げるために、標識方法を、cDNAマイクロアレイとの一致率の高かったrandom primer標識とした。この改良したプロトコルでCESHを行い、CESHで変化のあった領域から16遺伝子、変化のなかった領域から2遺伝子を選び、RT-PCRとcDNAマイクロアレイの結果と比較したところ、ほぼ完全に結果が一致した。以上のKato IIIでの検討結果はAGS細胞を使って繰り返した実験により、再現性が確認できた。また、Kato IIIを用いて、脱メチル化剤5-Aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-dC)による処理の前後のサンプルをそれぞれreference、testとしてCESHを行い、脱メチル化によって発現の亢進する10領域を同定し、そのうち7領域が、この細胞株でプロモータメチル化の存在が報告されている遺伝子を含んでいた。その中には、3q、19p、20qのように、false positive signalのため、これまでCESHで評価できなかった領域も含まれ、今回の改良で、CESHがglobalなexpression profilingのツールとして真に実用に堪えるものになったと言える。

2)では、1)でoptimizeした方法を原発の食道扁平上皮癌と未分化型胃癌の凍結材料に応用した。ゲノムコピー数変化とconcordantな染色体レベルの発現変化は、腫瘍内部位に関係なく(各腫瘍の異なるサンプル間で共通の)stemline変化に見られる傾向があった。一方、ゲノムコピー数変化とdiscordantな染色体レベルでの発現変化は、腫瘍の一部にみられることが多く、腫瘍の局所環境に応じた染色体レベルのepigeneticな発現調節がしばしば起こっていることが示唆された。

3)では、40例の未分化型胃癌に対して E-cadherin と  $\beta$ -catenin の免疫組織化学を行い、印環細胞癌に由来するものは、粘膜外に浸潤する際に、E-cadherin exon 8 の発現を(可逆的に)ダイナミックに変化させていること、浸潤性と細胞間接着の低下とは必ずしも平行しないことを明らかにした。このような変化の可逆性は、ゲノムの変化で説明することは難しく、環境からの誘導や epigenetic な変化によることが示唆された。

#### <次年度の研究計画と方法>

次年度は、1) 原発腫瘍の凍結材料を用いて CESH と CGH の結果を対比するアプローチを更に進め、癌の発現プロファイルに対する組織環境とゲノム構成の影響の割合が、早期癌と進行癌の間や、進行癌の病巣部と深部でどのように異なるかをあきらかにすること、2) E-cadherin exon 8 の発現(RT-PCR、免疫染色)に対するゲノムコピー数や epigenetic な変化の影響が粘膜内と深部浸潤部でどう異なるかを、検討することを目標とした。いずれのアプローチでも同一腫瘍の凍結切片から、表層部と深部の複数部位から腫瘍細胞を microdissection で採取し、DNA と RNA を抽出、それぞれ標識後 CGH と CESH/RT-PCR に用いる予定であった。これは食道癌については予定通り進めることができたが、未分化型胃癌については、一部の solid な腫瘍以外は十分な量の RNA の抽出が困難であったため、主として食道癌での解析を進めることとした。

食道癌に焦点を移すさいに、以下の実験を追加した。食道扁平上皮癌由来の細胞株 3 株 (KYSE180, KYSE410, KYSE1170) を用いて、原発腫瘍と同様に CESH と CGH を行うとともに、CESH で検出される染色体レベルでの発現の増減がどの程度メチル化やアセチル化などの epigenetic な変化を反映しているかを確かめるために、5-Aza-dC または histone deacetylase 阻害剤である trichostatin A (TSA) を投与する前後のサンプルをそれぞれ reference、test として CESH を行った。また環境の変化として、培養液の血清濃度を 20% に上げたもの、(嫌気性菌培養用の Anaeropack にて) 酸素濃度を低下させたものから RNA を抽出し、変化させないもの(2% FBS) を reference として CESH を行った。更に、原発腫瘍と細胞株の両方のサンプルで E-cadherin を含む 17 のがん関連遺伝子の発現とプロモータメチル化を定量的 RT-PCR と定量的メチル化特異的 PCR (qMSP) で解析した。

#### <次年度の結果と考察>

1)では、次のような興味深い結果が得られた。

1-1) 細胞株の実験から、CGH でゲノムコピー数は保たれながら CESH で発現低下 (negative induction) した染色体部位の多くが 5-Aza-dC で発現を回復し、negative induction はメチル化と関連していることが分かった。一方、CGH でゲノムコピーの増加がありながら CESH で発現が正常化 (negative compensation) した部位では、その多くが TSA で発現を回復したことから、negative compensation はヒストンの脱アセチル化と関連するとともに、メチル化とも強い逆相関があることが分かった。また、hypoxia によって発現が誘導される染色体領域は、TSA によって発現が回復する部位と大きく重なっていたことから、hypoxia はヒストンのアセチル化を修飾することが示唆された。さらに、BSA 濃度を上げることにより、Wnt シグナル系の遺伝子が局在する 3p, 8q, 11q で発現の亢進が誘導され、それぞれの領域で *CTNBI*, *MYC*, *CCND1* の発現亢進が qRT-PCR でも確認された。このように、CESH で見られる染色体

領域としての upregulation や downregulation は主として epigenetic な変化を反映しているものと考えられた。

1-2) 8 症例、19 サンプルの食道癌での CGH の結果から、3p-と 5q-は個々の腫瘍内の複数サンプルで共通に見られた変化(stemline 変化)として進行癌の 4 例全てに見られたが、早期癌では一部のサンプル(sideline)にしか見られなかった。このことは、早期癌と進行癌が系譜上異なる腫瘍であることを示唆している。

1-3) 原発腫瘍の CESH と CGH の比較から、CESH と CGH の concordance は、大型核の部分では深達度に関係なくが高く、stemline の方が sideline よりも高かった。concordance が高いほど遺伝子発現が環境から独立してゲノムコピー数依存性となり、生長の自律性が高いと考えられる。早期癌と進行癌の表層部(粘膜および粘膜下組織)では concordance の割合には有意差がなかったが、進行癌の表層部より、深部で concordance が有意に増加していた。早期癌と進行癌の表層部は concordance では差がなかったが、早期癌では induction が、進行癌の表層部では compensation が目立っていた。これは、進行癌でゲノムコピー数が大きく増加し、aneuploidy(→核も大型化する)になることを反映している。この染色体数の変化は、細胞の viability に大きく影響すると考えられるので、発現レベルでその影響を緩和する dosage compensation がまず起こると考えられるが、この compensation も深部では失われ、ゲノムコピー数依存性の遺伝子発現になり、生長の自律性を増していると考えられる。一方、腫瘍の進展とともに、プロモータ領域のメチル化が蓄積していることが分かった。これまではゲノムコピー数と発現とはおおむね平行するという報告が大半であったが、これは進行した腫瘍で検索されていたためであることが示唆される。今回の結果から、腫瘍進展の比較的早期には、ゲノムコピー数の変化を epigenetic に(特にアセチル化を修飾することによって)緩和させるメカニズムが存在し、それが、おそらくはメチル化の蓄積により、失われるにつれてコピー数依存性の自律的遺伝子発現に至るという道筋が見えてきた。この dosage compensation の起こるメカニズムを解明していくことによって、遺伝子発現の epigenetic regulation の研究が新たな方向に展開していくことが期待される。

1-4) 原発腫瘍と細胞株の染色体レベルでの遺伝子発現調節を比較すると、原発腫瘍では最終的に induction や dosage compensation が失われるが、細胞株は早期、あるいは進行癌の表層部に対応したパターンを示していた。これは、細胞株は腫瘍の浸潤深部から樹立されることが多いので、原発腫瘍の深部より更ゲノムコピー数依存性の更に強い(自律性の高い)パターンになるであろうという当初の予想に反する結果である。これは、in vivo という環境による selection が起こり、腫瘍の深部の細胞の発現パターンが変化したか、淘汰されたためと考えられる。このことは、培養株の遺伝子発現解析の注意点もしくは限界を示している。

1-5) 遺伝子レベルでは、早期食道癌の 4 例中 3 例で Wnt 系の活性化は見られなかったが、早期癌の 1 例と進行癌の表層部では Wnt 系の活性化が見られた。即ち、Wnt リセプターをコードしている *FZD1*、target 遺伝子である *CCND1* と *MYC* の発現誘導がみられた。*CTNNB1* の発現は正常か亢進していた。一方、進行癌の深部では、*CTNNB1* の発現が(genomic loss によって)失われ、*FZD1*、*CCND1* の発現誘導も失われていた。それに加えて、*TERT*、*TERC*、*PIK3CA*、*FOS* のゲノムコピーの増加と発現亢進も見られ、自律性生長のパターンとなっていた。これらの結果は染色体レベルでの変化と平行していた。

2)は主として胃癌で検討する予定であったが、食道癌で大きく研究が進んだ一方、胃癌での検討が遅れている。これは、胃癌ではDNA、RNAの enrichment が食道癌より格段に難しいことが最も大きな原因である。CGHによって、*CDHI* がマップされる16q22.1のDNAコピー数の減少が、未分化型胃癌の27例中16例と食道癌の8例中2例(早期癌、進行癌各1例)に見られた。そのうち早期食道癌では、CESHで16qの発現低下を伴っていない(dosage compensationがおこっている)ことがわかった。進行食道癌では、DNAコピー数の減少は病巣内の複数サンプルのすべてに見られた一方、CESHとRT-PCRでは最深部のサンプルのみで発現の低下が見られた。粘膜下組織までは、ゲノムコピー数の異常が(残存 alleleの)発現調節によって補われる一方、この dosage compensation は進展とともに失われていくことは上述のとおり一般にみられた現象である。胃癌で解析の終わった2例は、いずれも腺管腺癌からの脱分化で生じたと考えられる、solidな低分化腺癌であった。これらでは、全てのサンプルでCGHで16q-、CESH、RT-PCRと免疫染色で同部位の発現低下が見られ、これらの症例では比較的初期から dosage compensation が失われている可能性が示唆された。

#### <2年間の研究のまとめと今後の展望>

以上の染色体レベルおよび遺伝子レベルでの遺伝子発現とゲノムコピー数の比較解析から、腫瘍の進展過程で、大きなスケールの遺伝子発現の変化が、主として epigenetic な発現調節によって起こっていることが示唆された。(その epigenetic な機序により)腫瘍も進展の比較的初期には、環境からの誘導やゲノムコピー変化の緩和などがかなり起こっていること、そしてそれらは最後は失われ、ゲノムコピー数依存性の発現パターンに至るといった経路が見えてきた。同様のことをマイクロアレイでやろうとすると、膨大な bioinformatic analyses と経費を要すると思われる。今回の解析を可能にしたのは、前年度に確立したCESHの改良であった(Cancer Genet Cytogenet, 2007)。今後、この方法が活用されることを期待したい。現在 Genomics 関係の国際誌の論文はマイクロアレイ解析を含む遺伝子レベルの解析一辺倒であるが、CESHで得られる染色体レベルの情報の全てが遺伝子レベルの情報に還元できるわけではない。染色体レベルの発現解析は、特に大きなスケールの変化として起こる epigenetic な変化を解析するのに適しており、今後見直される時が必ず来ると考えている。

この研究では、多くの副産物が得られたが、最も明らかにしたかったのは、印環細胞癌に由来する未分化型胃癌の進展過程で E-cadherin が可逆的に変化することが epigenetic な変化で説明できるかどうかであった。この問題が今後の課題として残ったままである。その原因は、印環細胞癌に由来する未分化型胃癌はスキルスになることが多く、十分な量のmRNAを凍結切片から採取することが難しいことであったが、それを乗り越えるためには、今後 laser microdissection の精度を更に上げる必要がある。胃の未分化型胃癌では *CDHI*、*TP53*、*FGFR2*、*MET* 以外に発癌と進展にかかわる重要な遺伝子が知られていない。そのような場合こそ、染色体レベルの発現解析も加味して遺伝子発現の全貌を理解することから始めなければならないと考えている。